

Aus der Gastroenterologischen Abteilung
(Leiter: Prof. Dr. K. E. Hampel)
der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin
im Klinikum Westend (Direktor: Prof. Dr. G. A. Neuhaus)

PRÜFUNG EINIGER CANCEROGENER STOFFE
AUF DIE INDUKTION VON CHROMOSOMENBRÜCHEN
IN LEUKOZYTENKULTUREN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hannes Kuhn

aus Friedrichshafen

1972

Aus der Gastroenterologischen Abteilung (Leiter: Prof.Dr.K.E.Hampel)
der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin
im Klinikum Westend (Direktor: Prof.Dr.G.A.Neuhaus)

PRÜFUNG EINIGER CANCEROGENER STOFFE
AUF DIE INDUKTION VON CHROMOSOMEN-
BRÜCHEN IN LEUKOZYTENKULTUREN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hannes Kuhn
aus Friedrichshafen

Referent: Professor Dr.K.E. H a m p e l
Korreferent: Professor Dr.W. P r i b i l l a



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24.Aug.1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methode	3
III. Ergebnisse	
1. Einwirkung des Lösungsvermittlers Azeton auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten	7
2. Quantitative Auswertung der Chromosomen- veränderungen, induziert durch die verschie- denen Carcinogene	8
3. Verteilungsmuster der Aberrationstypen	12
4. Dosis-Wirkungsbeziehung	12
5. Abhängigkeit der Chromosomenaberrationen vom Zeitfaktor	16
6. DMBA induziertes Bruchverteilungsmuster	19
IV. Diskussion	28
V. Zusammenfassung	34
VI. Schrifttum	35



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Erste Vorstellungen über den Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und Veränderungen des genetischen Materials entwickelte BOVERI (12), der durch Experimente an Seeigelleiern zu dem spekulativen Schluß kam, daß der Ausgangspunkt eines Tumors in einem abnormen Chromosomenbestand der Zelle zu suchen ist. Die erstmalige experimentelle Auslösung einer Mutation durch Röntgenstrahlen (80) und die Erzeugung einer Hautgeschwulst durch Teerpinselungen (97) bildeten zusammen mit BOVERIs Hypothese die Grundlage der somatischen Mutationstheorie (7). Sie sieht in der Erbsubstanz als Träger der genetischen Information den Angriffsort der exogenen Reize, die nur dann krebserzeugend genannt werden dürfen, wenn sie die genetisch verankerte Steuerung des Zellverhaltens irreversibel schädigen (22). Folglich wird in der quantitativen und qualitativen Veränderung des genetischen Informationsbestandes der Zelle der Initialvorgang gesehen, der eine normale in eine Krebszelle verwandelt (8). Das für die somatische Mutationstheorie stärkste Argument, ein Carcinogen sei zugleich ein Mutagen, versuchte man für die cancerogenen chemischen Substanzen in zahlreichen Experimenten an verschiedensten Testobjekten zu beweisen (1,3,21,87). Insbesondere weisen die Arbeiten von DEMEREC (32) und STRONG (93,94) auf einen den Röntgenstrahlen vergleichbaren genetischen Effekt carcinogener Hydrocarbone hin.

Das Postulat einer parallel verlaufenden carcinogenen und mutagenen Wirksamkeit einer chemischen Substanz blieb jedoch nicht unwidersprochen. Teils wurden die Versuchsanordnungen kritisiert (87), teils wurde eine für die polycyclischen Kohlenwasserstoffe und aromatischen Amine aufgestellte Koinzidenz beider Wirkungsarten (2) von anderer Seite verneint (48). Es wurde auch darauf hingewiesen, daß die Mutagenität eines chemischen Carcinogens fast aus -

schließlich an Pilzen und Bakterien geprüft wurde, an Objekten, die phylogenetisch von der Säugetierzelle weit entfernt sind.

Wie weit die experimentellen Ergebnisse auseinanderklaffen, verdeutlicht eine tabellarische Gegenüberstellung des mutagenen und carcinogenen Effektes der wirksamsten chemischen Cancerogene, die auch in dieser Arbeit zur Anwendung kamen (48). Um dennoch zu einer einheitlichen Aussage über die Mutagenität eines chemischen Carcinogens zu kommen, ablesbar an den numerischen und strukturellen Veränderungen des Karyotyps einer Zelle, wurden vor allem die Chromosomensätze experimentell erzeugter Primärtumoren analysiert. Bei diesen in vivo Versuchen wurden besonders die numerischen Aberrationen berücksichtigt (9,38,53,54,66,91). Dagegen sind Mitteilungen über experimentell ausgelöste strukturelle Chromosomenaberrationen an Gewebekulturen von Säugetierzellen rar (46,68,72,79).

In der vorliegenden Arbeit soll die mutationsauslösende Wirkung stark wirksamer chemischer Cancerogene an menschlichen Leukozyten unter ausschließlicher Berücksichtigung struktureller Abberationen geprüft werden. Es wurde ein Zellsystem gewählt, das der Forderung nahekommt (47), den Nachweis zellulärer und molekularer Veränderungen im Zusammenhang mit der Carcinogenese nur an Zellsystemen zu führen, welche im Organismus eine cancerogene Umwandlung durchmachen können.

II. Material und Methode

Folgende Substanzen wurden in ihrem Verhalten auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten getestet.

Azeton (Lösungsvermittler)

Phenanthren (Nichtcarcinogene Vergleichssubstanz)

4-Dimethylaminoazobenzol (DAB)

p-Phenylendiamin (PHED)

p-Aminophenol (APH)

9,10-Dimethyl-1:2-benzanthracen (DMBA)

20-Methylcholanthren (MCA)

70 Kurzzeitkulturen peripherer Leukozyten wurden angesetzt. Davon konnten 58 ausgewertet werden, die restlichen Kulturen mußten wegen zu geringer Mitoseraten, wahrscheinlich infolge zu hoher Konzentration der geprüften Substanzen, verworfen werden. Jede der 70 Kulturen bestand aus 3-4 Kulturansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationsstufen der zu testenden Verbindung. Generell wurde die Azetonkonzentration mit 0,005 ml/ml Kulturmedium bei den verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen konstant gehalten. Jeder Kultur lief zusätzlich noch eine Kontrolle parallel, die allein 0,005 ml Azeton/ml Kulturmedium enthielt.

Die Versuche wurden nach der von MOOREHEAD et al.(78) entwickelten Methode geringfügig modifiziert durchgeführt. Auf sterile Bedingungen wurde geachtet. Aus einem stationären Krankengut wurden als Spender sogenannter normaler Leukozyten Patienten ausgesucht, die keine Behandlung mit ionisierenden Strahlen oder Zytostatika durchgemacht hatten. Ebenfalls unberücksichtigt blieben die Patienten, die Zeichen eines frischen Virusinfektes oder Krankheitsbilder boten, die mit Chromosomenanomalien einhergehen.

Das aus der Cubitalvene entnommene und durch wenige Tropfen Heparin ungerinnbar gemachte Blut wurde mit Bakto-Phythämagglutinin-M (Difco) versetzt. Dieser Stoff soll zusammen mit vorsichtigem Zentrifugieren eine Trennung der weißen von den roten Blutkörperchen bewirken, denn die von NOWELL (82) entdeckte mitotische Aktivität dieses pflanzlichen Mucoproteins ermöglichte erst die Chromosomenanalyse in Kurzzeitkulturen.

Jede Kultur erhielt zu Beginn möglichst exakt 10^7 Leukozyten. Das Kulturmedium setzte sich aus 30% autologem Plasma und 70% TC-Medium 199 (Difco) zusammen. Das Gesamtvolumen jeder Kultur betrug 10 ml, die Bebrütungszeit 72 Stunden. Bebrütet wurde wegen der photodynamischen Toxizität der carcinogenen Hydrocarbone unter Lichtabschluß.

24 Stunden vor Bearbeitung der Kulturen wurde das Carcinogen in verschiedenen Konzentrationen in einem konstanten Lösungsvolumen von 0,2 ml dazugegeben. In einer anderen Versuchsreihe wurde die Konzentration konstant gehalten und die Einwirkungszeit variiert. 90 Minuten vor Abbruch des Versuches wurde 1 ml einer 0,04%igen Colcemidlösung hinzugegeben, was eine Anreicherung der Mitosen in den Metaphasen verursacht. Die Ausbreitung der Metaphasen auf dem Objektträger erfolgte nach der Technik von ROTHFELS u. SIMINOVITCH (84). Die Auswertung der mit Orcein gefärbten Präparate geschah visuell bei 1280-facher Vergrößerung. Nur die übersichtlich ausgebreiteten Metaphasen, die keine Chromosomenüberlagerungen aufwiesen, wurden auf strukturelle Aberrationen hin untersucht. Jeweils 200 derartig gestaltete Metaphasen kamen zur Auswertung. Kulturen, in denen weniger als 25 Metaphasen auszuzählen waren, galten als nicht auswertbar und wurden verworfen. Die Chromosomen wurden in Anlehnung an die Denver Nomenklatur (30) beurteilt.

Ermittelt wurden:

1. Der Prozentsatz der von Chromosomenaberrationen erfaßten Metaphasen
2. Die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase
3. Das inter- und intrachromosomale Bruchverteilungsmuster.

Bewertung und Definition der Chromosomenanomalien

Folgende Struktur anomalies wurden bewertet:

1. Chromatidbrüche

Definiert sind sie als optisch leere Bezirke in der Linearstruktur des Chromatids. Eindeutig waren sie dann dieser Gruppe zuzuordnen, wenn eine Dislokation vorlag. War jene jedoch nicht deutlich, fiel eine Abgrenzung gegenüber achromatischen Läsionen (Gaps) schwer. Unter achromatischen Läsionen sind Feulgen-negative Regionen der Einzelchromatide, in selteneren Fällen auch beider Chromatiden, zu verstehen. Sie stellen keine echten Diskontinuitäten dar (83), in manchen Fällen kann ein Verbindungsfaden sichtbar sein. CHU (24) berücksichtigt die achromatischen Läsionen bei der Zählung der Chromatidaberrationen nicht, während andere Autoren wie NICHOLS (81) z.B. dieses tun.

In dieser Arbeit wurden Chromatidbrüche und achromatische Läsionen als ein Bruchereignis gewertet.

2. Isochromatid- bzw. Chromosomenbrüche

Darunter sind Brüche beider Chromatiden in gleicher Höhe zu verstehen. Zytologisch unterscheiden sich Chromosomenbrüche nicht von Isochromatidbrüchen. Diese sind vor der Reduplikation als Einzelbruch entstanden und bei der anschließenden Längsteilung auf beide Chromatiden übertragen worden. Sie wurden als zwei Brüche gewertet, da bei der gegebenen Versuchsanordnung induzierte Chromosomenbrüche nicht zu erwarten sind.

3. Azentrische Fragmente

Hier gilt es, gedoppelte von einzelnen azentrischen Fragmenten zu unterscheiden, wobei erstere paarweise angeordnete gedoppelte Bruchstücke darstellen. Sie liegen ohne Ausrichtung zu einem Chromosomengrundkörper in der Metaphase. Die gedoppelten azentrischen Fragmente wurden als ein zweifaches Bruchereignis gezählt. Davon abzugrenzen sind einzelne azentrische Fragmente, die als freie Chromosomenabschnitte imponieren und als einfacher Bruch gelten.

4. Dizentrische Chromosomen

Diese Chromosomenkonfiguration weist zwei Primäreinschnürungen auf, die durch Verschmelzung zweier Chromosomen nach einem abgelaufenen Bruchereignis entstanden sind. Diese Anomalie wurde als zweifaches Bruchereignis gewertet.

5. Translokationen

Dieser Begriff beinhaltet Reunionsprodukte von zwei oder mehreren Bruchenden und umfaßt den Austausch zweier Chromatidabschnitte zwischen homologen oder inhomologen Chromosomen. Die Bruchzahl der sichtbaren Translokationen wurde je nach Konfiguration mit zwei oder vier Brüchen angesetzt.

III. Ergebnisse

1.1 Einwirkung des Lösungsvermittlers Azeton auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten

Um eine carcinogene Substanz in der Leukozytenkultur testen zu können galt es vorab, die Rolle des Azetons als aberrationsauslösenden Faktor zu klären (Tab.1).

Tabelle 1 Auftreten von strukturellen Chromosomenanomalien menschlicher Leukozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Lösungsmittels

Lösungsmittel Azeton n ml/ml Kulturmedium	% der Metaphasen mit Aberrationen (n = 20)	Mittl.Zahl der Aberrationen pro Metaphase	n Kulturen
0,02	Mitosehemmung, destruierte Chromosomen	-	3
0,01	11 - 12	0,13 - 0,23	3
0,005	0,5- 4	0,005- 0,04	14
0,004	1	0,02	1
0,003	2	0,03	1
0,002	4	0,03	1

Eine Konzentration von 0,02 ml Azeton/ml Kulturmedium rief eine ausgeprägte Mitosehemmung hervor. Nur wenige Metaphasen konnten ausgemacht werden. Durch Verklumpung und Fragmentierung der Chromosomen waren sie erheblich verändert. In einem Konzentrationsbereich zwischen 0,002 und 0,005 ml Azeton/ml Kulturflüssigkeit stieg die Zahl der Chromosomen nicht über 4 %. Diese Zahl entspricht der Spontanrate an Brüchen ohne jeglichen Zusatz von Leukozytenkulturen. In den untersten Konzentrationsbereichen wurde nur eine Kultur angesetzt, da sie versuchstechnisch

ein exaktes Arbeiten nicht zuließen und somit als Kontrollgruppe bei der Carcinogenprüfung nicht in Frage kamen. Durch Einhaltung einer konstanten Konzentration von 0,005 ml Azeton/ml Kulturmedium konnten jedoch Bedingungen geschaffen werden, die die Testung eines Carcinogens ermöglichen.

1.2 Die nichtcarcinogene Vergleichssubstanz Phenanthren wurde in Konzentrationen zwischen 100 und 500 µg/ml Kulturmedium den Kulturen zugesetzt. Verglichen mit der cancerogenen Verbindung DMBA wurde Phenanthren bis zu 5-fach höher dosiert. Trotzdem konnten bei insgesamt 600 analysierten Metaphasen nicht mehr als 4 Brüche, berechnet auf 100 Metaphasen, gefunden werden. Diese Anzahl an Chromosomenbrüchen entspricht gleichfalls einer Bruchhäufigkeit, die der spontanen gleichzusetzen ist.

2. Quantitative Auswertung der Chromosomenveränderungen nach Hinzugabe verschiedener Carcinogene zu den Leukozytenkulturen

Die zur Anwendung gekommenen Cancerogene wurden in ihrer Wirksamkeit auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten nach 24-stündiger Einwirkungszeit gegenübergestellt (Tab. 2, S.9).

2.1 100 µg 9,10-Dimethyl-1:2-benzanthracen (DMBA)/ml Kulturmedium rief eine durchschnittliche Bruchhäufigkeit von 15 % bei Eckwerten von 12 bzw. 18 % hervor. Dieser Mittelwert wurde aus den Resultaten von 5 Kulturen gewonnen, die eine Auswertung von jeweils 200 Metaphasen zuließen. Reduzierte man die Dosis um ein Viertel, sank der Mittelwert auf 11 % ab. Wurde nun die Dosis von DMBA auf die Hälfte des Ausgangswertes vermindert, veränderte sich die prozentuale Bruchhäufigkeit nur noch geringfügig (10 %). Dieselbe Charakteristik ergab die Berechnung der mittleren

Tabelle 2 Gegenüberstellung der getesteten Substanzen in ihrer Wirkung auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten in vitro (bei einer konstanten Konzentration des Lösungsvermittlers Azeton von 0,005 ml/ml Kulturmedium)

Kultur Nr.		Konzentration (ug/ml)	% der Metaphasen mit Chromosomenaberrationen (n=200)	Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase
1 - 5	DMBA	100	12 - 18	0,16-0,30
6 - 8		75	8,5- 14	0,11-0,21
9 -14		50	8 - 12	0,10-0,25
15 -18		25	5 - 10	0,03-0,12
19 -20	MCA	75	13 - 14	0,17-0,22
21 -23		50	8,5- 10	0,11-0,13
24- 26	DAB	100-500	1 - 3	0,01-0,04
27- 28	APH	50-100	Mitoseschädigung, destruierte Chromosomen	
29- 30		25	18 - 25	0,25-0,49
31- 32	PHED	200	Mitoseschädigung, destruierte Chromosomen	
33- 35		100	14 - 19	0,19-0,30
36- 38		50	10 - 18	0,10-0,28
39- 40	Kontrollen (mit PHE-Zusatz)	100-500	1 - 4	0,01-0,03
41- 54	Kontrollen (ohne Zusatz)		0,5- 4	0,005-0,04

DMBA = 9,10-Dimethyl-1:2-bentantracen
MCA = 20-Methylcholanthren
DAB = 4-Dimethylaminoazobenzol
PH = p-Aminophenol
PHED = p-Phenylendiamin
PHE = Phenanthren

Bruchfrequenz pro Einzelmetaphase. Eine höhere Konzentration als 100 μ g DMBA/ml konnte nicht erreicht werden, ohne ungleiche Versuchsbedingungen zu erhalten, da die Substanz dann in 0,005 ml Azeton/ml nicht mehr vollständig in Lösung ging.

2.2 Die Behandlung der Leukozyten mit 2o-Methylcholanthren (MCA) ließ in äquivalenten Konzentrationen strukturelle Chromosomenveränderungen gleichen Ausmaßes entstehen. Hier war allerdings bei 75 μ g MCA/ml die Grenze der Löslichkeit erreicht. Die Bruchhäufigkeit der Metaphasen, die durch MCA induziert wurde, ist in ihrer Höhe der durch DMBA verursachten bei etwas engerem Streubereich gleichzusetzen, was in der geringeren Anzahl der ausgewerteten Kulturen begründet sein mag. Annähernd deckungsgleich mit den DMBA-Werten sind die der mittleren Bruchfrequenz pro Metaphase. Dieser Wert ist ein Index dafür, wie häufig die verschiedenen chromosomalen Brucharten an den Bruchereignissen beteiligt sind.

Aus der Tabelle 2 läßt sich erkennen, daß sich die mit den carcinogenen polycyclischen Hydrocarbonen DMBA und MCA ausgelöste Bruchhäufigkeit in Prozent deutlich von der bei der nichtcarcinogenen Vergleichssubstanz und den Kontrollen aufgetretenen unterscheidet. Der Unterschied ist ein nicht dem Zufall entsprechender und mit $p = 0,1$ % hoch signifikant (Tab.3, S.11a).

2.3 Gegensätzlich verhielt sich 4-Dimethylaminoazobenzol (DAB). Diese Substanz wurde in drei Konzentrationsstufen den Kulturen zugesetzt. 200 Metaphasen konnten pro Dosis-einheit ausgewertet werden. Obwohl die Dosis um das 5-fache gegenüber der vergleichbaren DMBA-Höchstosis gesteigert wurde, konnte in keinem der Ansätze eine Bruchfrequenz festgestellt werden, die die 3%-Grenze überschritt. Sie lag damit innerhalb der Streubreite der spontan auftretenden Brüche. Bei 500 μ g DAB/ml Einzeldosis wäre, vorausgesetzt,

die Substanz greift in den Mitoseablauf ein, entweder eine um diesen Betrag angestiegene Bruchhäufigkeit oder eine Mitosestörung zu erwarten gewesen.

2.4 Dadurch, daß strukturelle Chromosomenabweichungen nach der Einwirkung von DAB auf die Leukozyten ausblieben, richtete sich das Augenmerk auf die Abbauprodukte des Buttergelbs. Eine starke Wachstumshemmung der Leukozytenkulturen war nach Einwirken von 200 µg p-Phenylendiamin/ml Kulturmedium zu erkennen. Kennzeichnend war neben der gestaltlichen Veränderung der Chromosomen das Auftreten weniger Mitosen. Die Chromosomen erschienen verklumpt und zerbröckelt, zum Teil war eine Pulverisation eingetreten. Dieselben Zeichen der Mitoseschädigung konnten auch für p-Aminophenol erhoben werden, hier allerdings schon in einem Konzentrationsbereich von 50 und 100 µg/ml. Erst bei einer Konzentration von 25 µg APH/ml Kulturmedium stieg der Mitoseindex an, so daß es möglich war, 400 Metaphasen auszuwerten. Die Bruchfrequenz lag zwischen 18 und 25 %, die auf die Metaphase berechnete mittlere Bruchfrequenz ergab einen Wert von 0,49. Der im Vergleich zu den polycyclischen Carcinogenen DMBA und MCA erhöhte Wert der mittleren Bruchhäufigkeit läßt sich mit einem vermehrten Auftreten seltener Bruchereignisse wie z.B. dizentrische Chromosomen und Translokationen erklären.

Im Gegensatz dazu war die Beeinflussung der Mitose durch das andere Abbauprodukt des DAB p-Phenylendiamin nicht so ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 100 µg PHED/ml konnten ausreichend viele Metaphasen analysiert werden, ihre Bruchfrequenz lag zwischen 14 und 19 %. Reduzierte man die Dosis auf die Hälfte, dann bewegte sich die Häufigkeit der in Brüche verwickelten Metaphasen immerhin noch in einem Bereich zwischen 10 und 19 %. Die Aussage, die über die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase bei APH getroffen wurde, ließ sich auf PHED nicht übertragen. Sie lag bei einem Wert von 0,10 - 0,28 im Niveau der bei DMBA er-

Tabelle 3 Statistische Auswertung der durch DMBA und MCA induzierten prozentualen Bruchhäufigkeiten, die den Kontrollen mit und ohne Phenanthren-Zusatz gegenübergestellt sind, mittels des Vierfelder-testes

	Metaphasen mit Bruchereignissen	Metaphasen ohne Bruchereignisse		
DMBA	146	854	1000	$\chi^2=93,2$
Kontrolle (ohne Zusatz)	19	881	900	$n=1900$ $p < 0,00$
	Metaphasen mit Bruchereignissen	Metaphasen ohne Bruchereignisse		
MCA	54	246	300	$\chi^2=94,6$
Kontrolle (ohne Zusatz)	11	689	700	$n=1000$ $p < 0,00$
	Metaphasen mit Bruchereignissen	Metaphasen ohne Bruchereignisse		
DMBA	146	854	1000	$\chi^2=31,4$
Kontrolle (mit Phenanthren)	8	292	300	$n=1300$ $p < 0,00$
	Metaphasen mit Bruchereignissen	Metaphasen ohne Bruchereignisse		
MCA	54	246	300	$\chi^2=38,0$
Kontrolle (mit Phenanthren)	8	292	300	$n=600$ $p < 0,00$

hoben den mittleren Bruchhäufigkeit pro Metaphase.

3. Verteilung der Aberrationstypen

Wegen der niedrigen Bruchzahlen, die bei den übrigen Verbindungen auftraten, erfolgte die Aufschlüsselung der einzelnen Brucharten nur bei DMBA (Tab.4, S.13). Am häufigsten traten achromatische Läsionen und Chromatidbrüche auf, in absteigender Häufigkeit folgten Isochromatidbrüche und gedoppelte azentrische Fragmente. Relativ selten fanden sich Translokationen und dizentrische Chromosomen, welche mit einer Ausnahme bei der höchsten Konzentration des verwandten Carcinogens auftraten. Einzelne azentrische Fragmente konnten nicht entdeckt werden. Eine konzentrationsabhängige Prävalenz eines Aberrationstypes ließ sich nicht erheben.

Abb.1 (S.14) zeigt eine Metaphase (Kultur mit 100 µg DMBA/ml) mit mehreren Chromatidbrüchen und achromatischen Läsionen.

4. Dosis-Wirkungsbeziehung

Die Abhängigkeit der strukturellen Chromosomenveränderungen von der Konzentration der auf die Leukozyten einwirkenden Substanz konnte nur bei DMBA aufgezeigt werden, da die Bruchfrequenz bei den übrigen carcinogenen Substanzen zu gering und der Dosisbereich zu schmal waren. Die in den Abbildungen 2 und 3 (S.15 u.16) wiedergegebene graphische Darstellung des Effektes von DMBA in Beziehung zur gewählten Dosis basiert auf Werten, die aus Chromosomenanalysen nach 24-stündiger Einwirkungsdauer von 100 µg DMBA/ml gewonnen wurden. Der Maßstab ist ein nicht logarithmischer.

4.1 In Abbildung 2 ist die prozentuale Häufigkeit der von Brüchen erfaßten Metaphasen in Beziehung zur jeweiligen Konzentration aufgetragen. Es resultiert ein Kurvenverlauf,

Tabelle 4.

Quantitative Analyse der strukturellen Chromosomenveränderungen
nach 24 stündiger Einwirkung von DMBA

Kontrollen		DMBA $\mu\text{g/ml}$ Kulturmedium)									
		100		75		50		25			
Gaps +											
Chromatidbrüche	2 1 6 4	16	20	23	16	16	18	11	17	3	12 12 15 11 14 3
Isochromatidbrüche	1 - - 1	8	7	4	4	8	6	3	5	4	5 2 2 4 2 1
Bruchfrequenz	2 - - 2	16	14	8	8	16	12	6	10	8	10 4 4 8 4 2
azentrische Fragmente											
gedoppelte	- - - 1	12	6	3	4	6	5	3	6	6	5 2 3 3 2 1
Bruchfrequenz	- - - 2	24	12	6	8	12	10	6	12	12	10 4 6 6 4 2
einzelne	- - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- - - - -
Interchanges	- - - -	1	-	-	-	-	-	-	1	-	- - - - -
Bruchfrequenz	- - - -	4	-	-	-	-	-	-	2	-	- - - - -
dizentrische Chromosomen	- - - -	1	-	-	-	-	-	-	-	-	- - - - -
Bruchfrequenz	- - - -	4	-	-	-	-	-	-	-	-	- - - - -
Struktur anomalies											
pro Metaphase	0,02 0,01 0,03 0,04	0,30	0,22	0,19	0,16	0,21	0,17	0,11	0,18	0,25	0,16 0,10 0,12 0,12 0,11 0,03
% der Metaphasen mit Struktur anomalies	1,5 0,5 3 3	18	16	15	12	14	13	8,5	12	12	11 8 10 9 8,5 5
Zahl der ausgewerteten Metaphasen	200 200 200 200	200	200	200	200	200	200	200	100	200	200 200 200 200 100



Abb.1

Metaphase mit achromatischen Läsionen
und Chromatidbrüchen (100_{ug} DMBA/ml)

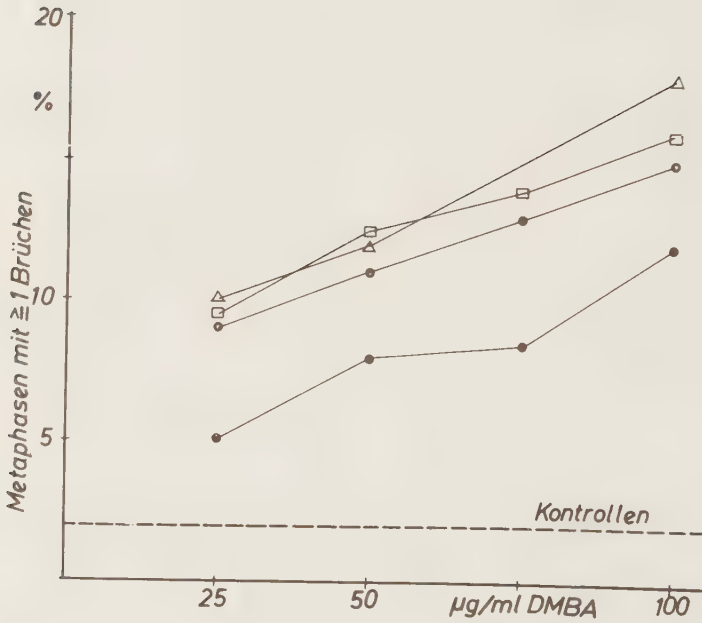


Abb.2 Dosisabhängigkeit struktureller Chromosomenveränderungen nach Zusatz von 9,10-Dimethyl-1:2-benzanthracen (menschlicher Leukozyten in vitro)

der einen dosisabhängigen Anstieg der durch DMBA induzierten Chromosomenaberrationen erkennen läßt und nahezu linear ist.

4.2 Trägt man nun in das Koordinationssystem, dessen Abszisse die Konzentration und dessen Ordinate die auf die Einzelmetaphase bezogene mittlere Bruchfrequenz darstellt, die errechneten Werte ein, stellt sich auch hier ein annähernd linearer Anstieg heraus (Abb.3, S.17).

5. Abhängigkeit der Chromosomenaberrationen vom Zeitfaktor

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß der Einwirkungszeit des DMBA auf die Auslösung chromosomaler Strukturabweichungen geprüft. Den Leukozytenkulturen wurde das Cancerogen jeweils 24 und 48 Stunden vor Abbruch des Kulturansatzes hinzugegeben. Aus vier Ansätzen konnten insgesamt 800 Metaphasen analysiert werden, 200 je Ansatz. Es wurden der Mittelwert der Metaphasen und das aus den Einzelwerten der mittleren Bruchfrequenz berechnete Mittel bestimmt (Abb.4, S.18).

5.1 Zahl der Chromosomenmutationen

Jeder einzelne Wert der prozentualen Bruchhäufigkeit lag bei der doppelten Einwirkungszeit höher als bei dem Basiswert nach einer 24-stündigen Einwirkung des Carcinogens. Der mittlere Zuwachs an Brüchen betrug $\bar{x} = 0,435$. Es galt zu ermitteln, ob die Nullhypothese, daß nämlich die Werte der prozentualen Bruchfrequenz in Abhängigkeit vom Zeitfaktor sich nicht hinreichend unterscheiden, anzunehmen oder zu verwerfen ist. In der Verteilung nach Student fand sich eine Grenzwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Bei der Feststellung, ob der Unterschied der mittleren Bruchfrequenz der Einzelmetaphasen in den gegenübergestellten Zeitwerten signifikant ist, war die Abweichung in der t-Ver -

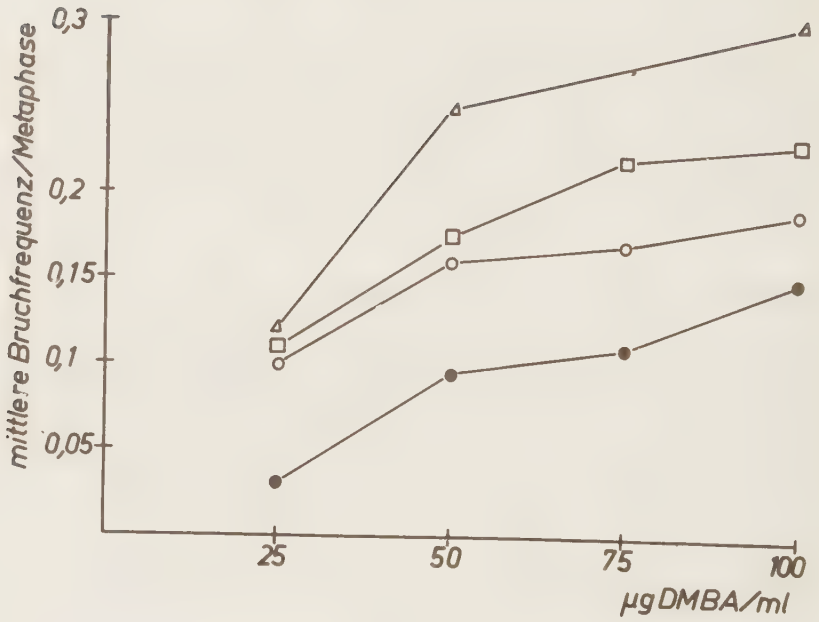


Abb. 3

Bruchfrequenz menschlicher Leukozytenchromosomen in vitro nach Zusatz von 9,10-Dimethyl-1:2-benzanthracen

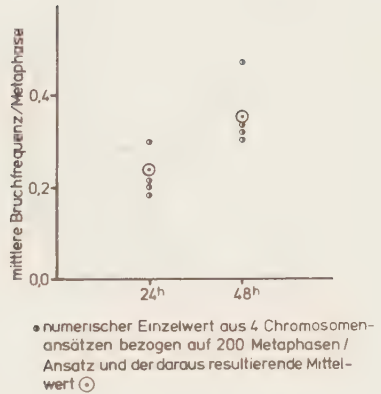
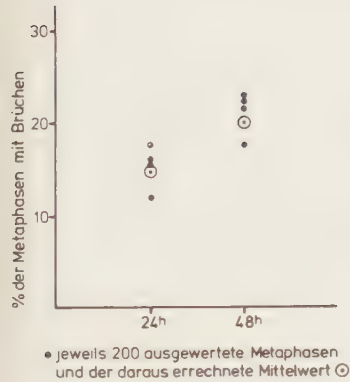


Abb. 4 Abhängigkeit der Chromosomenaberrationen vom Zeitfaktor

teilung ebenfalls auf dem 5% Niveau ($p < 0,05$) signifikant. Die Verwerfung der Nullhypothese sollte jedoch unter dem Aspekt beurteilt werden, daß zum einen der Stichprobenumfang mit $n = 4$ sehr klein ist und zum anderen die gebräuchliche Signifikanzgrenze bei $p = 5\%$ liegt.

5.2 Aberrationstypen

Die Auswirkung des Zeitfaktors auf die Zusammensetzung der verschiedenen Brucharten innerhalb eines Kulturansatzes läßt Tabelle 5 (S.20) erkennen. Außer dem veränderten Verhältnis Gaps/Chromatidbrüche ($48\text{ h} < 1 > 24\text{ h}$) stellt sich kein eindeutiger Unterschied dar. Das scheinbar häufigere Auftreten der mehrfachen Bruchereignisse nach 48-stündiger Behandlung der Kulturen mit DMBA muß wegen der kleinen Stichproben unberücksichtigt bleiben.

6. DMBA induziertes Bruchverteilungsmuster⁺⁾

Zur Aufstellung eines Bruchverteilungsmusters bedarf es einer ausreichenden Zahl von Chromosomenbrüchen. Nur mit DMBA gelang es, eine genügende Anzahl an Brüchen zu sammeln. Aus diesem Grunde wurde zur Erhebung eines Bruchverteilungsmusters ausschließlich DMBA herangezogen. Die Zuordnung der strukturellen Chromosomenveränderungen erfolgte an Leukozytenkulturen, die über 24 Stunden $100\text{ }\mu\text{g DMBA/ml}$ ausgesetzt waren. Die Chromosomen wurden entsprechend der Denver Nomenklatur (30) eingeteilt, in der je nach Länge der Chromosomen und Sitz des Zentromers folgende Chromosomen bzw. Chromosomengruppen unterschieden werden: 1,2,3,4-5,6-12 und X,13-15,16,17-18,19-20 sowie 21-22 und Y. Durch eine weitere Aufgliederung der Untereinheiten der Chromosomen-

⁺⁾ Die Lokalisierung der Brüche geschah unter Anleitung und Kontrolle von K.E.Hampel

Tabelle 5.

Abhängigkeit der Chromosomenaberrationen menschlicher Leukozyten in vitro vom Zeitpunkt des Zusetzens von 9, 10-Dimethyl-1:2-benzanthracen (100 μ g/ml)

Zeitpunkt des Zusatzes von DMBA in Stunden vor dem Abbruch der Kulturen													
	Kontrollen unbehandelt												
					24	48							
Achromatische Läsionen	2	1	4	3	10	11	16	2	7	13	17	7	
Chromatidbrüche	-	-	2	1	6	9	7	7	11	15	13	8	
Isochromatidbrüche	1	-	-	1	8	7	4	4	19	11	11	13	
Fragmente													
einzelne	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	
gedoppelte	-	-	-	1	12	6	3	10	17	6	5	9	
Interchanges	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	
dizentrische Chromosomen	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	
mittlere Zahl der Aberrationen/ Metaphasen	0,01	0,005	0,03	0,04	0,30	0,22	0,19	0,22	0,47	0,33	0,32	0,30	
% der Metaphasen mit Aberrationen	1,5	0,5	3	3	18	16	15	12	23	22	22	18	
Gaps/ Chromatidbrüche					1,9	1,2	2,3	0,3	0,6	0,8	1,4	0,9	
Zahl der bewerteten Metaphasen	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	

der Chromatide - in definierte Abschnitte war es möglich, die Brüche noch exakter zu lokalisieren. Dabei erwies sich die Unterteilung der Chromatide in drei gleich gro-
se Segmente am zweckmäßigsten (44). Das dem Zentromer am nächsten liegende Segment wird proximales, distales das am entferntesten liegende genannt, während intermediär das zwischen diesen Segmenten lokalisierte genannt wird. Wo möglich, wurde zwischen langem und kurzem Arm unter -
schieden. Bei dem median angeordneten Zentromer der Chro-
mosomen 3 bzw. 19-20 konnte diese Unterscheidung nicht ge-
troffen werden. Ferner war es naturgemäß nicht möglich, den kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen wegen sei-
nes geringen Ausmaßes in drei Segmente zu unterteilen. Als Aberrationen bewertet und den verschiedenen Chromatid-
segmenten unterschiedlicher Chromosomen bzw. Chromosomen-
gruppen zugeteilt wurden nur Chromatid- und Isochromatid-
brüche. Gaps blieben ebenso unberücksichtigt wie Fragmen-
te und Translokationen.

6.1 Interchromosomale Bruchverteilung

Die interchromosomale Bruchverteilung von 1000 registrier-
ten Chromosomenaberrationen nach der Einwirkung von DMBA
ist in Tab.6 (S.22) aufgeführt und in Abb.5 (S.23) ent-
sprechend graphisch wiedergegeben. Eine Aussage über die
Gesetzmäßigkeit einer Bruchverteilung läßt sich dann machen,
wenn man die beobachteten, lokalisierten Brüche mit den
theoretischen Werten einer gleichmäßigen Verteilung konfron-
tiert. Dies gelingt, wenn die Gesamtlänge der Chromosomen
einer Metaphase mit dem Wert von 1000 Einheiten festgesetzt
wird. Dadurch sind die relativen Längen der einzelnen Chro-
mosomen bzw. Chromosomengruppen und ihrer definierten Ab -
schnitte durch Messung bestimmbar. Zur Berechnung dieser
Längeneinheiten wurden die von LEVAN u. NICHOLS (67) mit-
geteilten Meßgrößen herangezogen. Damit war es möglich,
die beobachtete Bruchfrequenz der erwarteten gegenüberzu-
stellen, vorausgesetzt, eine gleichmäßige Verteilung der

Tab.6 Interchromosomale Verteilung der Chromosomen-
aberrationen, induziert durch 9,10-Dimethyl-
1:2-benzanthracen

Chromosomen Nr.	Relative Länge = erwartete Bruch- freq. bei gleich- mäßiger Verteilung (E)	Beobachtete Bruchfrequenz (B)
1	86,27	86
2	81,63	141
3	69,60	64
4 - 5	121,47	124
6 -12, X	363,55	426
13-15	101,65	66
16	30,93	34
17-18	56,33	38
19-20	45,66	6
21-22, Y	42,91	15
	1000,00	1000

$$\chi^2 = 124,58$$

$$FG = 9$$

$$p < 0,0005$$

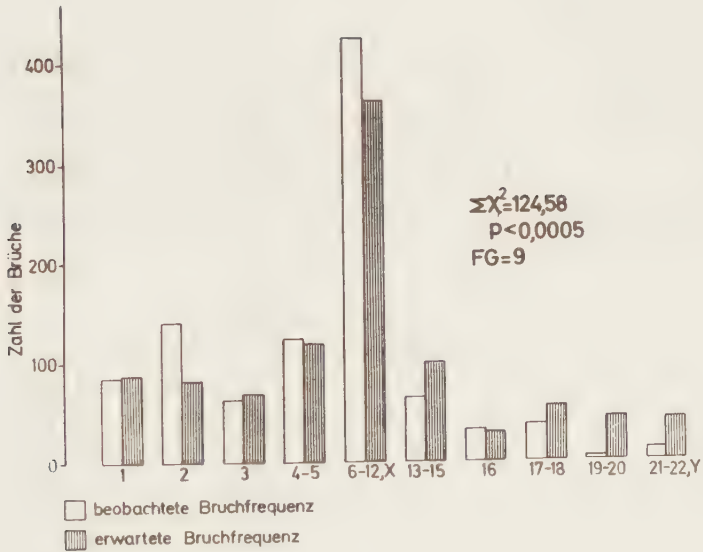


Abb. 5

Interchromosomales Bruchverteilungsmuster
nach Einwirkung von 9,10-Dimethyl-1:2-
benzanthracen

Brüche liegt vor. Denn nur dann wäre die relative Länge der Chromosomen bzw. Chromosomengruppen gleich der in ihnen auftretenden Bruchzahl.

Durch die Bestimmung des χ^2 -Wertes konnte die Nullhypothese einer rein zufälligen interchromosomalen Bruchverteilung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,0005$ verworfen werden.

Die graphische Darstellung der interchromosomalen Bruchverteilung (S.23, Abb.5) verdeutlicht das Abweichen der gezählten von den erwarteten Brüchen. Einen Überschuß an Brüchen weisen die großen Chromosomen auf, besonders herausragend die Chromosomen Nr.2 sowie Nr.6-12 und X. Davon ausgenommen werden muß Chromosom Nr.3, das ebenso wie die kleinen Chromosomen ein Defizit an Brüchen hat.

6.2 Intrachromosomales Bruchverteilungsmuster

Die Gesamtlänge der Chromosomen einer Metaphase wurde wiederum auf 1000 Einheiten festgelegt, wobei die Längenrelationen der einzelnen Chromatidsegmente aus den von LEVAN u. NICHOLS (67) mitgeteilten Meßdaten errechnet wurden. Vorausgesetzt wiederum, es läge eine gleichmäßige Verteilung der Chromatidbrüche vor, so wäre die relative Länge der einzelnen Chromatidabschnitte der Zahl der in dieser Längeneinheit auftretenden Brüche proportional. Das würde bedeuten, daß die Werte der relativen Segmentlänge, welche bei gleichmäßiger Verteilung den erwarteten Werten (E) gleichzusetzen sind, der in diesen Segmenten gezählten Brüche (B), einander gegenübergestellt, entsprechen.

Die intrachromosomale Verteilung von 1000 durch DMBA induzierten Chromatid- bzw. Isochromatidbrüche gibt die Tab.7 (S.25) wieder. Der aus den Werten der beobachteten (B) und den erwarteten (E) Bruchfrequenzen gebildeten χ^2 -Wert ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,0005$. Die Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen intrachromosomalen Bruchverteilung (Nullhypothese) läßt sich mit grosser Sicherheit zurückweisen, da die Abweichung auf dem

Tabelle 7 Intrachromosomale Verteilung der durch 9,10-Dimethyl-1:2-benzanthracen induzierten Chromatidbrüche

Chromosomen-segmente		Relative Länge = erwartete Bruch- frequenz bei gleich- mäßiger Verteilung	Beobachtete Bruchfrequenz	B/E	χ^2
		(E)	(B)		
1	l d	15,25	30	1,96	14,26
	i	15,25	12	0,78	0,69
	p	15,25	21	1,37	2,16
	k d	13,84	7	0,50	3,38
	i	13,84	9	0,65	1,69
2	p	13,84	7	0,50	3,38
	l d	16,57	32	1,93	14,36
	i	16,57	34	2,05	18,33
	p	16,57	27	1,62	6,56
	k d	10,64	21	1,97	10,08
3	i	10,64	9	0,84	0,25
	p	10,64	18	1,69	5,09
	+ d	23,20	30	1,29	1,99
	i	23,20	23	0,99	0,00
	p	23,20	11	0,47	6,41
4- 5	l d	28,80	35	1,21	1,33
	i	28,80	28	0,97	0,02
	p	28,80	18	0,62	4,05
	k d	11,69	10	0,85	0,24
	i	11,69	23	1,96	10,78
6-12, X	p	11,69	10	0,85	0,24
	l d	80,46	128	1,59	28,08
	i	80,46	68	0,84	1,92
	p	80,46	92	1,14	1,65
	k d	40,39	39	0,96	0,04
13-15	i	40,39	65	1,60	14,99
	p	40,39	34	0,84	1,01
	l d	29,49	27	0,91	0,21
	i	29,49	25	0,84	0,68
	p	29,49	14	0,47	8,13
16	k	13,18	-	-	13,18
	l d	6,19	11	1,77	3,73
	i	6,19	7	1,13	0,10
	p	6,19	3	0,48	1,64
	k	12,36	13	1,05	0,03
17-18	l d	13,81	15	1,08	0,10
	i	13,81	8	0,57	2,44
	p	13,81	8	0,57	2,44
	k +	14,90	7	0,46	4,18
	-	45,66	6	0,13	34,44
19-20	l	34,14	15	0,43	10,73
21-22, Y	k	8,77	-	-	8,77
		1000,00	1000		220,19
					FG =41
					P < 0,0005

l = langer Arm, k = kurzer Arm, d = distales Segment, i = intermediäres Segm.
p = proximales Segment

0,05%-Niveau signifikant ist.

Die nicht zufallsbedingte Ungleichmäßigkeit der Bruch - verteilung gibt die graphische Darstellung (Abb.6,S.27) wieder. Aus ihr geht hervor, daß insgesamt gesehen die großen Chromosomen häufiger am Bruchgeschehen beteiligt sind. Innerhalb dieser Gruppe findet man einen Überschuß an Brüchen vor allem in den distalen Segmenten der langen Arme der Chromosomen Nr.6-12 und X. Aber auch in den distalen Segmenten der langen Arme der Chromsomen Nr.1, 3 und 4-5 treten gehäuft Chromatidbrüche auf. Dasselbe läßt sich von den intermediären Segmenten der kurzen Arme der Chromsomen Nr.4-5 sowie 6-12 und X sagen. Ein Defizit an Brüchen hingegen findet sich generell in den kleinen Chromosomen mit Betonung der Chromosomen Nr.19-20 und 21-22 und Y.

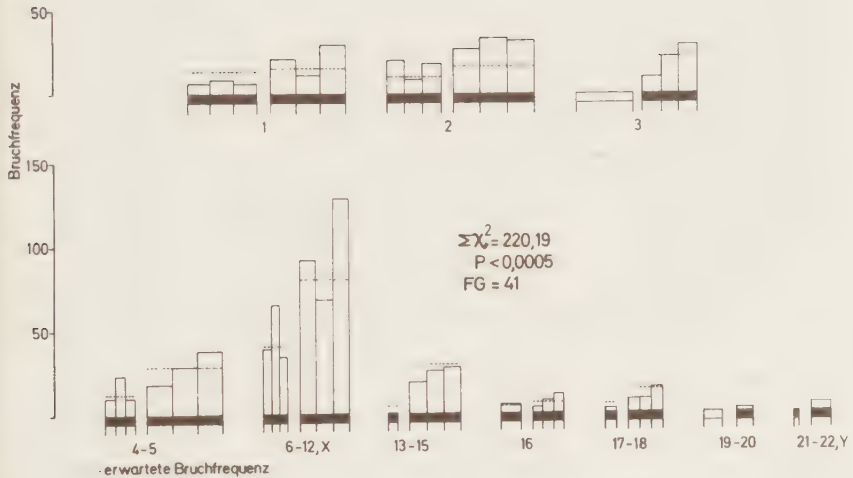


Abb.6: Intrachromosomales Bruchverteilungsmuster nach
Einwirkung von 9,10-Dimethyl-1:2-benzanthracen

Die schwarz gezeichneten Figuren symbolisieren die kurzen und langen Arme des jeweiligen Chromosoms oder der Chromosomengruppe, die rechts bzw.links von dem Zwischenraum angeordnet sind, der das "Zentromer" darstellen soll. Die Chromosomenarme sind je nach Längenrelation in die definierten Chromosomenabschnitte - distal, intermediär und proximal - unterteilt.

IV. Diskussion

MILLERs Deletionstheorie (76,77) basiert auf der Annahme, daß die Proteine den zellulären Rezeptor eines Carcinogens darstellen. Den MILLERs selbst gelang es, die Bindung des DAB an Zellproteine nachzuweisen (74). HEIDELBERGER (49, 50) und DAVENPORT (29) berichten von einer Bindung der polycyclischen aromatischen Amine an Proteine. Auffallend war bei diesen Versuchen eine quantitative Übereinstimmung zwischen der Bindung an Zellproteine und der carcinogenen Aktivität der getesteten Substanzen. Auf der anderen Seite konnten zahlreiche Autoren (14,16,31,40,69,96) eine Bindung der genannten Verbindungen an die Nukleinsäuren der Zelle aufzeigen. Hier bestand in vivo ebenfalls eine strenge Korrelation zwischen DNS-Bindung und Carcinogenität (13), wohingegen eine derartige Wechselwirkung in vitro vermißt wurde (28). BOYLAND (17,18) war es, der den Einbau der Carcinogene in die DNS demonstrieren konnte, ein Vorgang, der als Einschlußmechanismus in die Primärstruktur der DNS definiert ist (27). BROOKES (15) geht noch einen Schritt weiter, indem er die Proteinbindung in ihrer Wertigkeit für die Carcinogenese eindeutig hinter die der DNS-Bindung stellt.

Die vorliegenden Ergebnisse über die Induktion von Chromosomenmutationen durch die polycyclischen Hydrocarbone DMBA und MCA lassen sich mit den biochemischen Mitteilungen einer Interaktion dieser Verbindungen mit DNS, RNS und Proteinen in Einklang bringen, wenn man davon ausgeht, daß morphologisch auffindbare Chromosomenveränderungen ein großes, dennoch untrügliches Kriterium der mutagenen Wirkung einer Substanz sind (42).

Eine Aussage über den wahren "mutativen" Effekt der Carcinogene auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten konnte erst gemacht werden, nachdem die Wirkung des Lösungsvermittlers Azeton aufgedeckt war.

Die ermittelte Dosis-Wirkungsbeziehung läßt eine Schädigung der Mitose bei einem Azetongehalt der Kulturen von 2 % erkennen, ein Befund, den v.MÖLLENDORF (79) in seinen zytologischen Studien ebenfalls erhebt. Eine Konzentration von 0,25 - 0,5 % Azeton beeinflußt das Wachstum der Gewebekulturen nicht (72,79). In dieser Arbeit betrug der Azetonanteil bezogen auf das Gesamtvolumen der Leukozytenkulturen 0,5 %, dabei lag die Bruchfrequenz im Niveau der spontan auftretenden Brüche.

Phenanthren, eine Substanz ohne cancerogene Aktivität (33, 60), diente als nichtcarcinogene Vergleichssubstanz. Chemisch lassen sich die carcinogenen aromatischen Hydrocarbone DMBA und MCA von dieser Substanz herleiten. Trotzdem Phenanthren fünffach höher dosiert wurde als dieselben, bewegte sich die Zahl der Brüche, die beobachtet wurden, innerhalb der Variationsbreite der spontanen Chromosomenaberrationen; ein Resultat, das KATO (58) an demselben Testsystem erhielt.

DAB, dessen Carcinogenität erstmals KINOSITA (63) an der Ratte bewies, zeigte dasselbe Bruchverhalten wie die nichtcarcinogene Vergleichssubstanz Phenanthren. Diese Diskrepanz in dem Ausbleiben der Chromosomenmutationen und der bekannten carcinogenen Eigenschaft könnte dadurch erklärt werden, daß diese Substanz den Wirkort nicht in optimaler Konzentration erreicht, um mutationsauslösend zu wirken. Auch könnte das biochemische Schicksal des DAB den Mangel an Chromosomenmutationen menschlicher Leukozyten erklären. Die MILLERS (73,74,75), die sich am eingehendsten mit dem Stoffwechsel und der Hepatombildung des DAB an der Ratte befaßt haben, sehen in einem Azofarbstoff-Proteinkomplex den eigentlichen cancerogenen Faktor, da ein an Protein gebundener Farbstoff bisher ausschließlich in der Leber von Ratten, am Ort der Tumorbildung, entdeckt werden konnte (34,77). Man könnte sich vorstellen, daß sich dieser Vorgang allein in der Leberzelle abspielt und nicht auf ein

anderes Zellsystem übertragen werden kann (38). Die Art-spezifität und Organotropie der Wirkung des Buttergelbs (38,88) sind wahrscheinlich die Ursache, warum an den Chromosomen des in vitro Testsystems die Aberrationsinduktion ausbleibt. Diese spezifische Wirksamkeit gilt nicht nur für die Cancerogenität (63,76,88), auch Mutationen konnten bisher nur am Gewebe der Rattenleber nachgewiesen werden (39,70,71). Dies impliziert, daß die Zelle der Rattenleber durch metabolische Aktivierung das cancerogene Agens freisetzt, das auch für die Mutagenität verantwortlich gemacht werden könnte.

p-Aminophenol und p-Phenylendiamin entstehen durch reduktive Aufspaltung der Azobrücke als Hauptabbauprodukte des DAB (90). Sie werden als carcinogene Wirkstoffe diskutiert, da sie zum einen an DNS kovalent gebunden vorgefunden wurden (96), zum anderen die von MILLER postulierte Farbstoff-Proteinverbindung ein p-Phenylendiamin-Proteinkomplex sein soll (11). MILLER selbst hält diese Abbauprodukte für inaktiv (75).

Aus der Stärke der Aberrationsentstehung an menschlichen Leukozyten eine carcinogene Wirksamkeit dieser Abbauprodukte ableiten zu wollen, erscheint verfrüht. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei dem Effekt dieser Stoffwechselprodukte um einen unspezifisch toxischen und nicht primär mutagenen handelt. Diese Vermutung wird durch Experimente bestätigt, die von einer Enzymhemmung in vitro (23,62) und einer Zerstörung der Lymphozyten (23) durch diese Substanzen berichten. Eine sichere Aussage über die Wirkung der Abbauprodukte des DAB wäre jedoch nur durch Prüfung an verschiedenen Testobjekten möglich.

Im Gegensatz zu Phenanthren und DAB stand die Chromosomenschädigende Wirkung der cancerogenen polycyclischen Hydrocarbone MCA und DMBA. Beide Stoffe gelten wegen ihrer hohen Carcinogenität als Paradesubstanz der experimentellen Tumorforschung (4,10,25,26,61). Jüngst gelang es, die cancerogene Aktivität des MCA in vitro zu demonstrieren (37, 51).

Der Nachweis der Mutagenität von MCA und DMBA wurde vorwiegend in Tierversuchen durchgeführt, die in ihren Ergebnissen insgesamt uneinheitlich ausfielen. Als bevorzugte Testobjekte erwiesen sich die Mikroorganismen. So wurde bei *Escherichia coli* (86), Pilzen (5,6) und der Taufliege (2,19) eine im Vergleich zu den Kontrollen höhere Mutationsrate gefunden. FAHMY (35,36) konnte an der Taufliege als genetischem Testsystem zeigen, daß MCA und DMBA "Minutes", aber keine Punktmutationen oder Chromosomenbrüche verursachten. Währenddessen konnte DEMEREC (32) nach der Gabe von MCA an der Taufliege Chromosomenbrüche entdecken. BOYLAND (17) war es möglich, an der Ratte nach DMBA-Einwirkung Chromosomenbrüche nachzuweisen. AUERBACH (3) und BURDETTE (20,21) kommen bei der Mutagenitätsprüfung von MCA und DMBA zu negativen Ergebnissen. HECKER (48) verneint eine mutagene Wirkung dieser Cancerogene und SCHINZ (87) ist der Meinung, daß kein überzeugendes Experiment existiert, das die mutationsfördernde Wirkung der cancerogenen polycyclischen Hydrocarbone beweist.

In dieser Arbeit wurden an einem in vitro Testsystem durch MCA und DMBA induzierte Chromosomenmutationen gefunden. Das muß kein Widerspruch sein, da in vitro kultivierte Zellen anders als unter in vivo-Bedingungen reagieren können (83). Carcinogene, die an Mikroorganismen nicht mutagen wirken, können an höher entwickelten Zellsystemen eine Mutagenität entfalten, da sich Stoffwechselvorgänge bezüglich der chemischen Cancerogene nicht gleichsetzen lassen. HUBERMANN (56) nimmt an, daß das cancerogene Agens durch metabolische Aktivierung der polycyclischen Hydrocarbone freigesetzt wird, welche die Zellen der Mikroorganismen nicht zu leisten vermögen.

Die Bruchfrequenz lag bei MCA und DMBA signifikant höher als bei der nichtcancerogenen Vergleichssubstanz und den Kontrollen. HUANG (55) und KATO (57) bestätigen dieses Resultat durch Versuche an anderen Gewebekulturen. Eine von

den Kontrollen deutlich abgehobene Bruchfrequenz konnte auch mit diesen Substanzen an Knochenmarkzellen der Ratte (65) bzw. des chinesischen Hamsters (58,59) gesehen werden.

Am eingehendsten konnte die Wirkung des DMBA auf die Chromosomen menschlicher Leukozyten untersucht werden, da bei dieser Substanz die meisten Chromosomenbrüche gefunden wurden. Es fand sich eine annähernd lineare Dosis-Wirkungsbeziehung, die von anderen Autoren bestätigt wird (58,59,65).

Die durch DMBA induzierten Chromosomenmutationen zeigen eine nicht zufällige, ungleichmäßige Verteilung. Die Abweichung von der zufälligen Verteilung scheint generell für chemisch ausgelöste Mutationen zu gelten, da bei einer Reihe anderer Verbindungen und Objekte dasselbe Verhalten auftrat (45,54,89).

Die Bruchverteilung zwischen den Chromosomen ließ eine Bevorzugung der großen Chromosomen bzw. Chromosomengruppe 6-12 und X erkennen. Sie wird gleichfalls von anderer Seite beschrieben (58,59). Bei der Aufschlüsselung der Brüche innerhalb der Chromosomen findet sich ein Überschuß an Brüchen in den distalen Segmenten der langen Arme der Chromosomengruppe 6-12 und X. Diese Anhäufung könnte mit der Beobachtung in Zusammenhang gebracht werden, daß der lange Arm des X-Chromosoms besonders bruchsensibel ist (55,58,59).

In den kleinen Chromosomen bzw. Chromosomengruppen besteht ein Defizit an Brüchen, was mit einer größeren Resistenz gegenüber Brüchen oder mit einer größeren Neigung zur Restitution erklärt werden könnte (92).

Bei der Beurteilung des Bruchverteilungsmusters und seiner statistischen Aussage dürfen die möglichen Fehlerquellen nicht unerwähnt bleiben. In erster Linie ist an subjektive Fehler bei der visuellen Zuordnung der Brüche zu den Chromatidabschnitten der einzelnen Chromosomen bzw. Chromosomengruppen zu denken. Es wäre auch vorstellbar, daß die Aberrationen in den kleinen Chromosomen schlechter sichtbar sind. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß es sich um Veränderungen handelt, die auf die Chromosomenpräparation zurückzuführen sind (92). Letztlich können auch individuell-

le Streuungen eine Rolle spielen, da es sich um verschiedene Leukozytenspender handelt.

Die in dieser Arbeit beobachteten Chromosomenmutationen, induziert durch die polycyclischen Hydrocarbone MCA und DMBA an einem in vitro Zellsystem, beweist noch keineswegs die Mutagenität dieser Verbindungen. Die Frage muß weiterhin offen bleiben, ob diese Substanzen generell als Mutagene anzusehen sind.

Gelingt es für die einzelnen chemischen Carcinogene an verschiedenen Testobjekten spezifische Muster von Chromosomenmutationen aufzustellen, gewänne man einen weiteren Einblick in die Carcinogenese, denn nach TRAININ (95) sind diese Muster ein Ausdruck der gemeinsamen Endstrecke am Rezeptor, welche man als Carcinomentstehung ansehen könnte.

V. Zusammenfassung

Verschiedene Carcinogene wurden auf ihren mutationsauslösenden Effekt an den Chromosomen menschlicher Leukozyten hin geprüft. Als nichtcarcinogene Vergleichssubstanz diente Phenanthren.

Ebenso wie bei Phenanthren wurde bei dem cancerogenen 4-Dimethylaminoazobenzol eine Aberrationshäufigkeit gefunden, die im Niveau der spontan entstehenden Chromosomenbrüche lag. Dieses Verhalten des Buttergelbs an dem in vitro Zellsystem wurde mit der Artspezifität und der Organotropie der Wirkung dieser Substanz erklärt. Als eigentlicher cancerogener Wirkstoff des Buttergelbs wurden seine Stoffwechselprodukte p-Aminophenol und p-Phenylendiamin diskutiert. Die beobachteten Chromosomenaberrationen wurden als zytotoxischer Effekt dieser Verbindungen interpretiert.

Die Carcinogene MCA und DMBA aus der Reihe der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wirkten in Bezug auf die Mutationsauslösung quantitativ und qualitativ gleichartig. Sie induzierten im Vergleich zu den Kontrollen und der nichtcarcinogenen Vergleichssubstanz Phenanthren einen signifikanten Unterschied der Chromosomenaberrationen. Es wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung und ein inter- und intrachromosomales Bruchverteilungsmuster der durch DMBA ausgelösten Brüche aufgestellt. Es ließ sich eine nicht zufallsgemäße Verteilung der Chromosomenmutationen aufstellen. Dabei fanden sich in den großen Chromosomen bzw. Chromosomengruppen ein Überschuß an Brüchen, wobei besonders das distale Segment des langen Armes der Chromosomengruppe 6-12 und X herausragte, währenddessen sich in den kleinen Chromosomen ein Defizit an Chromosomenveränderungen abzeichnete.

Es wird darauf hingewiesen, daß eine Aussage über die Mutagenität dieser Substanzen erst dann zu treffen ist, wenn weitere Untersuchungen an verschiedenen Testobjekten vorliegen.

VI. Schrifttum

1. AUERBACH, C., J. M. ROBSON
The production of mutation by chemical substances.
Proc. roy. Soc. Edinb. 62, 271-283 (1947)
2. AUERBACH, C.
Chemical mutagenesis.
Biol. Rev. 24, 355-391 (1949)
3. AUERBACH, C.
The chemical production of mutations.
Science 158, 1141-1147 (1967)
4. BACHMANN, W. E., E. L. KENNAWAY, N. M. KENNAWAY
Rapid production of tumors by two new hydrocarbons.
Yale J. Biol. Med. 11, 97-102 (1938)
5. BARATT, R. W., E. L. TATUM
An evaluation of some carcinogens as mutagens.
Cancer Res. 11, 234-236 (1951)
6. BAUCH, R.
Experimentelle Auslösung von Gigas-Mutationen bei der Hefe durch cancerogene Kohlenwasserstoffe.
Naturwissenschaften 30, 263-264 (1942)
7. BAUER, K. H.
Die Mutationstheorie der Geschwulstentstehung.
Springer Verlag, Berlin 1928

8. BAUER, K.H.
Das Krebsproblem.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1949,
1963
9. BAYREUTHER, K.
Chromosomes in primary neoplasie growth.
Nature 186, 6-9 (1960)
10. BERENBLUM, J.
The carcinogenic action of 9,10-Dimethyl-1:2-Benzanthracene on the skin and subcutaneous tissues of the mouse, rabbit, rat and Guinea pig.
J.nat.Cancer Inst. 10, 167-174 (1949/50)
11. BERENBOM, M., J. WHITE
Metabolism of N¹⁵-labeled p-Dimethylaminoazobenzene in rats.
J.nat.Cancer Inst. 12, 583-590 (1951)
12. BOVERI, Th.
Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.
G.Fischer Verlag, Jena 1914
13. BROOKES, P., P.D.LAWLEY
Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: Relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to DNA.
Nature 202, 781-784 (1964)
14. BROOKES, P., P.D.LAWLEY
Reaction of some mutagenic and carcinogenic compounds with nucleic acids.
J.Cell comp.Physiol.Suppl. 1, 111-128 (1964)
15. BROOKES, P.
Reaction of some carcinogens with nucleic acids.
Cancer Res. 26, 1994-2003 (1966)

16. BOYLAND, E.
Different types of carcinogens and their possible mode of action.
Cancer Res. 12, 77-84 (1952)
17. BOYLAND, E.
Mutagens.
Pharmacol. Rev. Vol. 6 No. 3, 354-364 (1954)
18. BOYLAND, E., E. GREEN
The interaction of polycyclic hydrocarbons and nucleic acids.
Brit. J. Cancer 16, 507-517 (1962b)
19. BURDETTE, W. J.
Lethal mutation rate in *Drosophila* treated with 2o-Methylcholanthren.
Science 112, 303-306 (1950)
20. BURDETTE, W. J.
Tumor incidence and lethal mutation rate in *Drosophila* treated with 2o-Methylcholanthren.
Cancer Res. 12, 201-205 (1952)
21. BURDETTE, W. J.
The significance of mutation in relation to the origin of tumors: A review.
Cancer Res. 15, 201-226 (1955)
22. BUTENANDT, A., H. DANNENBERG
Die Biochemie der Geschwülste.
Handbuch der allg. Pathologie VI/3 (1956), 107-241
Springer Verlag
23. CHAMBERS, R., G. CAMERON, M. C. KOPAC
The effects in tissue cultures of N',N,N',N'-Tetra-methyl-o-phenyldiamine and other compounds on malignant lymphnodes.
Cancer Res. 3, 293-295 (1943)

24. CHU, E.H.Y.

Dose relations in the induction of human chromosomal aberrations.
In Wolff, S.: Radiation induced chromosomes aberrations.
New York a. London 1963

25. COOK, J.W.

In discussion an experimental production of malignant tumors.
Proc. roy. Soc. 113, 455-484 (1933)

26. COOK, J.W., E.L. KENNAWAY

Chemical compounds as carcinogenic agents.
Amer. J. Cancer 33, 50-97 (1938)

27. DANNENBERG, H.

Zum Wirkungsmechanismus krebserzeugender Faktoren.
Dtsch. med. Wschr. 88, 605-616 (1963)

28. DANNENBERG, H.

Zur Frage der Wechselwirkung zwischen Nukleinsäuren und aromatischen Kohlenwasserstoffen und Aminen.
Molekulare Biologie des malignen Wachstums.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966, 96-104

29. DAVENPORT, G.R.

The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissues. XII Fraction of mouse skin protein.
Cancer Res. 21, 559-610 (1961)

30. Denver study group

A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes.
J. Amer. med. Ass. 174, 159-162 (1960)

31. DINGMANN, C.W., M.B. SPORN

The binding of metatolites of Aminoazo-Dyes of rat liver DNA in vivo.
Cancer Res. 27, 938-944 (1967)

32. DEMEREC, M.
Production of mutations in *Drosophila* by treatment with some carcinogens.
Science 105, 634 (1947b)
33. DRUCKREY, H., D. SCHMÄHL, H. DANNENBERG
Konstitution und Wirkung cancerogener, aromatischer Substanzen.
Naturwissenschaften 17, 393-397 (1952)
34. EULER, v., H., B. v. EULER, H. HASSELQUIST
Chemische Vorgänge bei der Hepatombildung in Ratten durch Eingabe von Dimethylaminoazobenzol.
Z. Krebsforsch. 59, 652-665 (1954)
35. FAHMY, O. G., M. J. FAHMY
Specific genetic deletions by a carcinogenic hydrocarbon in *Drosophila*.
Nature 224, 1328-1329 (1969)
36. FAHMY, O. G.
Gene elimination in carcinogenesis, reinterpretation of the somatic mutation theorie.
Cancer Res. 30, 195-205 (1970)
37. FLAKS, A., J. M. HAMILTON
In vitro effects of chemical carcinogens.
Europ. J. Cancer 6, 151-154 (1970)
38. GLÄSS, E.
Die Chromosomenzahlen in der durch Buttergelbverfütterung krebsig entarteten Rattenleber.
Z. Krebsforsch. 63, 362-371 (1960)
39. GLÄSS, E.
Die chromosomalen Veränderungen in der Rattenleber während der krebsigen Entartung nach Verfütterung von Buttergelb.
Z. Krebsforsch. 63, 294-310 (1960)

40. GOSHMAN, L., C. HEIDELBERGER
Findings of Tritium labeled polycyclic hydrocarbon
to DNA of mouse skin.
Cancer Res. 27, 1678-1687 (1967)
41. GRIFFIN, A.C., E.L. BRANDT, E.L. TATUM
Induction of tumors with Nitrogen Mustards.
Cancer Res. 11, 253-256 (1951)
42. GRUNDMANN, E.
Über intrazelluläre Vorgänge während der Car-
cinogenese.
Münch.med.Wschr. 108, 1662-1667 (1966)
43. HADDOW, A.
Advances in the study of chemical carcinogenesis.
Proc.roy.Soc.Med. 44, 263-266 (1951)
44. HAMPEL, K.E., G. PALME
Chromosomenstudien bei akuter und chronischer
myeloischer Leukämie.
Neoplasma 11, 113-122 (1964)
45. HAMPEL, K.E.
Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromo-
somen des Menschen.
Int.J.Clin.Pharmacol. 14, 322-370 (1968)
46. HEARNE, M.
Induced Chiasma formation in somatic cells by an
carcinogenic hydrocarbon.
Nature Vol.141, 291 (1936)
47. HECKER, E.
Neue biochemische Gesichtspunkte bei der Kanzeri-
sierung.
Krebsforschung und Krebsbekämpfung 6, 77-96 (1967)

48. HECKER, E.
Biologische und molekular-biologische Probleme
der Tumorgenese.
In: Grundlagen der Tumorgenese.
2. Deidesheimer Gespräch 1968, 84-115
49. HEIDELBERGER, Ch.
The relation of protein binding to hydrocarbons.
Ciba Foundation Symp. of Carcinogenesis London 1959,
179-192
50. HEIDELBERGER, Ch.
Studies of the molecular mechanism of hydrocarbon
carcinogenesis.
J. cell comp. Physiol. 64: Suppl. 1, 129-148 (1968)
51. HEIDELBERGER, Ch., T. T. CHEN, P. T. IYPE
Malignant transformation with carcinogenic hy-
drocarbons.
Advanc. Enzymol. 7, 339-356 (1969)
52. HELLSTRÖM, K. E.
Chromosomal studies of primary Methylcholanthren-
induced sarcoms in the mouse.
J. nat. Cancer Inst. 23, 1019-1933 (1959)
53. HSU, T. S.
Numerical variation of chromosomes in higher
animals.
In: Developmental Cytology, 16th Growth Symp. pp.
47-62 New York: Ronald Press 1959
54. HSU, T. S.
Longitudinal differentiation of chromosomes and
the possibility of interstitial telomeres.
Exp. Cell. Res. (Suppl. 9): 1963, 73-85
55. HUANG, C. C.
Induction of a high incidence of damage to the
X-chromosomes of Rattus (Mastomys) natalensis by
base analogues, viruses and carcinogens.
Chromosoma 23, 162-179 (1967)

56. HUBERMAN, E., L. ASPIRAS, Ch. HEIDELBERGER, Ph. L. GROVER, P. SIMS
Mutagenicity to mammalian cells of exposides and other derivatives of polycyclic hydrocarbon.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash) 68, 3195-3199 (1971)
57. KATO, R.
Chromosomal studies on carcinogenesis in the Chinese Hamster.
Berlinska Boktryckeriet Lund 1968, 1-8
58. KATO, R.
Chromosome breakage induced by a carcinogenic hydrocarbon in Chinese Hamster cells and human leukocytes in vitro.
Hereditas 59:1, 120-141 (1968)
59. KATO, R., M. BRUZE, Y. TEGNER
Chromosomes breakage induced in vivo by a carcinogenic hydrocarbon in bone marrow cells of the Chinese Hamster.
Hereditas 61:2, 1-15 (1968)
60. KENNAWAY, E. L.
Carcinogenic substances and their fluorescence spektra.
Brit. med. J. I, 1044-1048 (1930)
61. KENNAWAY, E. L.
Further experiments on cancer producing substances.
Amer. J. Cancer 24, 497-504 (1930)
62. KENSLER, C. J., S. O. DEXTER, C. P. RHOADS
The inhibition of a Diphosphopyridine-Nucleotide system by split products of Dimethylaminoazobenzene.
Cancer Res. 2, 1-10 (1942)
63. KINOSITA, R.
Special report: Studies on the carcinogenic chemical substances.
Trans. Soc. Jap. Path. 27, 665-727 (1937)

64. KOSIR,A.
Über das cancerogene Agens.
Oncologia 4, 109-115 (1952)
65. KURITA,Y., T.SYGUIYAMA, Y.NISHIZUKA
Chromosomes aberrations induced in rat bone marrow cells by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene.
J.nat.Cancer Inst. 43, 635-641 (1969)
66. LEVAN,A., J.BIESELE
Role of chromosomes in carcinogenesis as studies in serial tissue culture of mammalian cells.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 71, 1022-1053 (1958)
67. LEVAN,A., W.W.NICHOLS
Human chromosome lenghts for use in distribution studies.
Hereditas 51, 378-380 (1964)
68. LEWIS,M.R.
The photosensibility of chick-embryo cells in media containing certain carcinogenic substances.
Amer.J.Cancer 186, 305-309 (1935)
69. LIQUORT,A.M., B.de LERMA
Interaction between DNA and polycyclic aromatic hydrocarbons.
J.molec.Biol. 5, 521-526 (1962)
70. MARQUARDT,H.
Neuere experimentelle Ergebnisse zur Mutations-hypothese der chemisch induzierten krebsigen Ent-artung.
Dtsch.med.Wschr. 90, 389-403 (1965)
71. MARQUARDT,H.
Erbänderungen somatischer Zellen und ihr Anteil bei experimenteller Krebsauslösung.
Naturwissenschaften 46, 217-223 (1959)

72. MAUER, G.

Untersuchungen über die Einwirkung kanzerogener Kohlenwasserstoffe auf Gewebekulturen.

Arch.exp.Zellforsch. 21, 191-211 (1938)

73. MILLER, J.A., C.A. BAUMANN

The carcinogenicity of certain azo dyes related to p-Dimethylaminoazobenzene.

Cancer Res. 5, 227-234 (1945)

74. MILLER, E.C., J.A. MILLER

The presence and significance of bound aminoazo-dyes in the livers of rats fed p-Dimethylaminoazobenzene.

Cancer Res. 7, 468-480 (1947)

75. MILLER, J.A., E.C. MILLER

The carcinogenicity of certain derivatives of p-Dimethylaminoazobenzene in rat.

J.exp.Med. 87, 139-155 (1948)

76. MILLER, E.C., J.A. MILLER

Die Biochemie der Krebsentstehung in der Leber.

Unger und Domröse Verlag, Herne i.W. 1952

77. MILLER, J.A., E.C. MILLER

The carcinogenic aminoazo-dyes.

Advanc.Cancer Res. 1, 339-396 (1953)

78. MOOREHEAD, P.S., P.C. NOWELL, W.J. MELLMANN, D.M. BATTIPS, D.A. HUNGERFORD

Chromosomes preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.

Exp.Cell Res. 20, 613-616 (1960)

79. MÖLLENDORF, v., W.

Zur Kenntnis der Mitose XII. Fortgesetzte Untersuchungen über den Einfluß von Kohlenwasserstoffen und Steroiden auf das Wachstum. Versuche an Gewebekulturen und Froschlaich, Beziehung zum bösartigen Wachstum.

Z.Zellforsch. 32, 35-82 (1942)

80. MUELLER, H.J.
Artificial transmutation of the gene.
Science 66, 84-87 (1927)
81. NICHOLS, W.W.
In vitro chromosomes breakage induced by arabino-
syladenine in human leukocytes.
Cancer Res. 24, 1502-1504 (1964)
82. NOWELL, P.C.
Phythamagglutinin: An initiator of mitosis in
cultures of normal human leukocytes.
Cancer Res. 20, 462-466 (1960)
83. RIEGER, R., A. MICHAELIS
Chromosomenmutationen.
In: Genetik, Beitrag 6 VEB, G. Fischer Verlag,
Jena 1967
84. ROTHFELS, K.H., L. SIMINOVITCH
An air-drying technique for flattening chromosomes
in mammalian cells grown in vitro.
Stain Technol. 33, 73-77 (1958)
85. RUSH, H.P.
Carcinogenesis: A fact of living processes.
Cancer Res. 14, 407-417 (1954)
86. SCHERR, G.H., M. FISHMAN, R.H. WEAVER
The mutagenicity of some carcinogenic compounds
for Escherichia coli.
Genetics 39, 141-149 (1954)
87. SCHINZ, H.R., H. FRITZ-NIGGELI
Wirkung cancerogener Stoffe auf den Mutations-
prozeß.
Oncologia 4, 121-130 (1952)

88. SCHMÄHL, D.
Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren.
Editio Cantor 2.Aufl. 1971
89. SHAW, M.W., M.M.COHEN
Chromosome exchanges in human leukocytes induced by mitomycin C.
Genetics 51, 181-190 (1965)
90. STEVENSON, E.S., K.DOBRINER, C.D.RHOADS
The metabolism of Dimethylaminoazobenzene in rats.
Cancer Res. 2, 160-167 (1942)
91. STICH, H.F.
Chromosomes of tumor cells. I. Murine leukemias induced by one or two injections of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene.
J.nat.Cancer Inst. 25, 649-661 (1960)
92. STOPIK, D., K.E.HAMPEL
Studie zur intrachromosomalen Bruchverteilung bei menschlichen Leukozyten.
1971, im Druck
93. STRONG, L.C.
The induction of germinal mutations by chemical means.
Am.Naturalist 81, 50-59 (1947)
94. STRONG, L.C.
Genetik und Krebs.
Z.Krebsforsch. 56, 208-224 (1949)
95. TRAININ, N.A., M.KAYE, J.BERENBLUM
Influence of mutagens on the initiation of skin carcinogenesis.
Biochem.Pharmacol. 13, 263-267 (1964)

96. WARWICH, G.P., J.J. ROBERTS

Persistent binding of butter yellow metabolite
in rat liver RNA.

Nature 213, 1206-1207 (1967)

97. YAMAGIWA, K., K. ISCHIKAWA

Experimentelle Studie über die Pathogenese der
Epithelialgeschwülste.

Mitteilungen aus der Med. Fakultät der Universität
Tokio 15, 295-344 (1916)

Lebenslauf

Als Sohn des Dipl.-Ing.Fritz Kuhn und seiner Ehefrau Martha geb.Köbele wurde ich am 6.4.1943 in Friedrichshafen geboren.

Nach der Grundschulausbildung Besuch des Graf-Zeppelin-Gymnasiums in Friedrichshafen bis zur Obersekunda, dann Wechsel auf die Oberrealschule in Lindau; 1963 Abitur. Noch im gleichen Jahr Aufnahme des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin. Ärztliche Vorprüfung im August 1966. Nach zwei klinischen Semestern in Wien und Lübeck Fortsetzung des klinischen Studiums an der Freien Universität Berlin, im März 1970 ärztliche Prüfung.

1 Jahr Medizinalassistentenzeit.

Zur Zeit bin ich als Assistenzarzt in der Städtischen Klinik für Lungenkrankheiten Heckeshorn tätig.

